

親水性モディファイアを用いるイオン対逆相分配クロマトグラフィーの高性能化

著者	高橋 透
号	2317
発行年	1998
URL	http://hdl.handle.net/10097/7590

氏 名	たかはし とおる 高橋 透
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の根拠法規	学位規則第4条第1項
授与学位	博士(工学)
研究科、専攻の名称	東北大学工学研究科(博士課程)応用化学専攻
学位論文題目	親水性モディファイアを用いる イオン対逆相分配クロマトグラフィーの高性能化
指導教官	東北大学教授 四ツ柳 隆夫
論文審査委員	主査 東北大学教授 四ツ柳 隆夫 東北大学教授 奥脇 昭嗣 東北大学教授 宮野 壮太郎

論文内容要旨

科学の基本は、物質の本質を明らかにすることにある。物質をその構成要素に分けることは、古来より、科学における重要な方法論の一つであり、今日の最新の科学においても、分離・精製技術がキーテクノロジーの一つであることに変わりはない。高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)は、溶質特性の差を利用する多段分離システムであり、現在、最も汎用性の高い分離・精製技術の一つである。HPLCの分離モードの一種である、イオン対逆相分配(IPRP-)HPLCは、イオン対の二相間分配現象を利用する手法で、荷電化学種の高感度・高選択的な分離・分析法として、生化学関連の有機物分析から、無機イオンの分析まで、広範な分野において利用されている。本研究では、IPRP-HPLCの高速化、選択性の向上を目的として、新しい移動相モディファイアの検討を行った。以下に、本研究の概要を記す。

第1章 序論

微量成分の計測において、バックグラウンドシグナルの分離を含む、共存マトリックスからの分離は、すなわち数桁の検出感度の向上を意味する。こういった観点から、今や、微量分析において分離化学の手法を導入することは高感度計測システム設計のための基本戦略の一つと考えてよい。HPLCや高性能キャピラリー電気泳動法(HPCE)はその最たるものである。これらの分離システムにおける分離の高性能化が高感度計測の鍵を握っているとの観点から、本研究では逆相分配HPLCにおける分離の高性能化を目的とした。また、現在、一般に広く用いられているシリカゲルやオクタデシルシリル化シラン(ODS)等の固定相を用いた分離は、溶質分子の固定相に対する分配特性の僅かな違いをクロマトグラフィーの段数に頼って識別するものと言える。従って、こういった分離に特別の“特異性”を見出すことは困難であるが、普遍的な相互作用に頼る“非特異的なシステム”であるからこそ、様々な分子を分離することができる。保持時間の調節因子の増加は、分離選択性の制御因子の増加を意味し、高度な分離を約束するものである。本研究では、この様な視点に基づき、現在、最も汎用性の高いODS系固定相をベースとした分離システムに、分離選択性の新しい制御因子として親水性モディファイア(親水性対イオン、水構造破壊試薬)を導入し、新規のIPRP-HPLCシステムを提案しようとするものである。

第2章 4-(2-ピリジルアゾ) レソルシノール錯体の選択的固相抽出ー

イオン対逆相分配クロマトグラフィーを用いる ppt レベルのバナジウムの定量

環境指標物質として有用な、大気粉塵中のバナジウムの定量を目的として、固相抽出 - 一滴溶媒濃縮法による前段濃縮法と、4-(2-ピリジルアゾ) レソルシノール(PAR) - 金属錯体による KD-HPLC システムとのマッチングをはかり、超微量バナジウム定量法を開発した。本法の検出限界は 4 ppt (S/N=3) であり、実用レベルに十分対応できる感度を有している。PAR - 金属錯体による KD-HPLC システムでは、V(V), Co(III), Fe(III) および Ni(III) の錯体だけがクロマトグラム上にピークをあたえるが、さらに、CyDTA (トランス-1,2-ジアミノシクロヘキサン-N,N',N'-四酢酸) によるマスキング法を併用することにより、大気粉塵試料中に含まれる多量の共存マトリックスから、V(V) の選択的検出が可能である。また、性質の異なる対イオン、すなわち一段階目では親水性対イオン、二段階目では疎水性対イオンを利用する二段階のイオン対固相抽出にによって、Co(III), Fe(III), Ni(III) 錯体、および過剰錯形成試薬 (PAR) の大部分を除去し、V(V) 錯体だけを選択的に固相に抽出することに成功した。

第3章 親水性対イオンを用いるイオン対逆相分配クロマトグラフィー

従来、イオン対逆相分配 HPLC では、この手法がイオン対溶媒抽出の概念に立脚して生まれた経緯、ならびに、分配特性の大きく異なる多様な溶質を一斉分析する観点から、荷電化学種の強力な保持を目指した初期の研究の流れを受け、イオン対試薬として、疎水性イオン（第四級アンモニウムイオン、長鎖アルキルスルホン酸イオン）が用いられてきた。これに対し、本研究では pH 緩衝成分やアルカリ金属イオン等の親水性イオンを対イオンとして用いる、新しいイオン対逆相分配 HPLC を開発した。2,2'-ジヒドロキシアゾベンゼン (DHAB) - 金属錯体アニオンの逆相分配 HPLC において親水性対イオンとして、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン pH 緩衝成分およびその類縁体、ナトリウムイオンをはじめとするアルカリ金属イオン、アンモニウムイオンまたはグアニジウムイオンを用い良好な分離を達成した。従来、対イオンとして テトラブチルアンモニウムイオンを用いるシステムでは、V(V), Co(III), Al(III) および Fe(III) の各 DHABI - 金属錯体アニオンの分離時間は 20 分程度要したが、上記の親水性対イオンを用いることにより、10 分以内に短縮された。また、分離時間の短縮を達成しつつ、分離度の低下は見られなかった。親水性対イオンモードも、疎水性対イオンモードと同様、イオン対分配に基づいたシステムとして位置づけることができる。また、本システムで培われる技術は、HPLC 分離技術に技術革新をもたらす。つまり、イオン対溶媒抽出の概念に基づく従来のシステムとは全く性格を異にし、古典的な IPRP-HPLC の設計思想から脱却した、新しい概念を提唱するものである。

第4章 水構造破壊試薬を用いる水溶液を移動相とする逆相分配クロマトグラフィー

通常、逆相分配 HPLC では、ODS のように、シリカゲル表面にアルキル鎖の化学修飾を施した固定相と、水（極性溶媒）にメタノールやアセトニトリル等の低極性有機溶媒を添加した混合溶媒移動相を用いることが多い。水系移動相を用いた場合、移動相の有機溶媒分率が低下（20wt%以下）すると、固定相のアルキル鎖を溶媒和できる溶媒分子（有機溶媒）が減少し、疎水性相互作用により固定相鎖同士が絡み合い、これが、分離効率の低下、ピークのブロード化の原因となる。尿素やグアニジン塩酸塩といった水構造破壊試薬は、タンパク質の変成剤として知られている。本章では、水構造破壊試薬を用いて固定相鎖の制御を試み、有機溶媒を使用しない逆相分配 HPLC システムの開発を行った。PAR - 金属

錯体アニオンの逆相分配 HPLC において、水 - メタノール移動相でメタノール分率を 15 wt%、ナトリウムイオンを対イオンとし、移動相に尿素を添加したところ、添加しない場合に比べ、保持時間が短縮され、ピークの尖鋭化が見られた。ニトロフェノール誘導体およびナフタレンスルホン酸誘導体を分離モデルとして、有機溶媒を全く含まない移動相を用いる逆相分配 HPLC の検討を行った。移動相中の尿素濃度の増加につれ、保持時間およびピークの半値幅は減少し、理論段数は増加した。また、同時にカラム中の移動相体積の減少、すなわち固定相体積の増加が見られ、グアニジウム塩酸塩でも同様に移動相体積は減少し固定相体積が増加したことから、水構造破壊試薬により固定相アルキル鎖の状態制御（溶媒和）が可能であることを見出した。溶質の保持時間の減少から、尿素、グアニジンは固定相だけではなく、溶質にも疎水性水和構造破壊の効果を示すと思われる。水構造破壊試薬水溶液を移動相溶媒として用いることで、従来の ODS 系固定相を用いても（特殊なカラムの必要なしに）、有害な有機溶媒を一切使用しない逆相分配 HPLC が可能である。従来の逆相分配 HPLC では移動相モディファイアーとして、有害な有機溶媒を多量に使用する。ここで提案する、水構造破壊試薬水溶液を移動相溶媒として用いる逆相分配 HPLC システムでは、有機溶媒を大幅に削減、もしくは全く使用しないことが可能であるため、移動相溶媒の廃液処理問題を解決することができただけでなく、人体および環境への負荷を大いに軽減することができるものと確信する。

第 5 章 イオン対分配系に対する水構造破壊試薬の影響

前章では、尿素やグアニジンといった水構造破壊試薬を HPLC 移動相に添加することで、固定相アルキル鎖のコンホメーション（溶媒和分子の減少による疎水性相互作用に基づく絡み合い）の制御に成功した。この現象は、疎水性水和構造とも呼ばれる水の三次元的構造的破壊がキーになっていると考える。本章では、この現象の理解、および、もはや“水ではない水”といっても過言ではない濃厚な水構造破壊試薬水溶液を利用する、二相間分配現象に基づいた新たな分離システムの開発のための知見を得ることを目的とした。疎水的なイオンのイオン対生成および第二相への移行もまた疎水性相互作用を推進力とする系であるから、水構造破壊試薬をイオン対分配系での制御因子として利用可能であると考えた。疎水性相互作用に基づくイオン会合の新しい制御因子として、水構造破壊試薬に注目した。これを分離選択性の制御因子として利用する二相間分配現象に基づいた新たな分離システムの開発のための知見を得るべく、イオン対分配系に与える水構造破壊試薬の効果について検討を行った。イオン対溶媒抽出、IPRP-HPLC のいずれの系においても、水構造破壊試薬の添加により、イオン対の生成および分配能の低下が見られた。また、尿素、グアニジンでのイオン対分配系に与える効果の違いが見られた。イオン対分配系における選択性制御の新しい因子としての水構造破壊試薬の可能性が示唆された。また応用例としては、イオン間相互作用を分離の駆動力とする流れ分離システム（例えば HPCE）における分離選択性の新しい制御因子としての水構造破壊試薬の利用が期待される。

第六章 総括

本論文は、イオン対逆相分配高性能液体クロマトグラフィーにおける分離選択性の新しい制御因子として、親水性モディファイア（親水性対イオン、水構造破壊試薬）を用いる新規の RP-HPLC システムを提案し、その知見についてまとめたものである。微量・超微量成分の計測システムの設計にあたり、今日性を考えたとき、特定の部位に局在した元素の測定や状態分析を必要としない場合、すなわち、総

量としての微量成分の計測が重要な場合においては、特殊かつ高価な装置を使用する機器分析はもはや意味をなさず、高度かつ精密な設計思想のもとに構築された計測システムによるケミカル・アプローチが重要な意味を持つ。こういったケミカル・アプローチの一つとして、HPLCやHPCEといった“分離装置付き流れ分析システム”を位置づけることができる。これらのシステムでは、共存物質と目的成分との分離が検出感度の向上を意味することを考えると、分離の高性能化が高感度計測の鍵を握るといっても過言ではない。本論文で提案した分離選択性の新しい制御因子としての親水性モディファイア、親水性対イオンおよび水構造破壊試薬は、新規性のみならず実用性の面でも優れているものと確信する。また、特に水構造破壊試薬はHPLCだけでなくHPCEへの導入が可能であるから、今後のこの方面での応用が待たれる。さらに、概念として見ても、疎水性相互作用やイオン会合といった分子間相互作用の制御因子として、水構造破壊試薬を利用した研究としては本研究がフロンティアとしての役割を果たすものと確信する。

審査結果の要旨

逆相分配高性能液体クロマトグラフィー (RP- HPLC) は汎用性のある最も強力な分離分析手法であるが、その分離機構上、移動相としては水溶性有機溶媒の使用が必須であるとされてきた。この論文は伝統的な移動相に代わる新たな分離機能移動相として、親水性モデファイア、親水性対イオン、及び水構造破壊試薬を含む水溶液の有用性を明かにし、従来の概念を一新した成果をまとめたものであって、全編6章からなっている。

第1章は序論であって、本論文の目的と意義について述べている。

第2章ではバナジウム(V)-4-(2-ピリジルアゾ)レソルシノール錯体と1,2-シクロヘキサン-N,N,N,N-四酢酸からなる選択発色系、親水性対イオンとしてナトリウムイオンを利用する二段階イオン対固相抽出法、一滴溶媒濃縮法及び速度論的識別モードRP- HPLCとからなる高度に選択的な複合計測システムを構築して、バナジウム(V)に対して濃度感度 5×10^{-11} Mを達成してその大気中のバナジウム計測への可能性を明らかにしている。

第3章では水-メタノール混合溶媒を移動相とする2,2'-ジヒドロキシアゾベンゼン錯体のイオン対逆相分配クロマトグラフィーにおいて、従来の疎水性対イオンにかわって、親水性対イオンの利用が可能であり、かつ高性能であることが明らかにしている。即ち、ナトリウムイオン、pH緩衝液成分、グアニジウムイオン、等を対イオンとして用いて、分離係数を維持しながら保持時間を5分の1以下することに成功している。さらに、キャパシティブクターの対イオン濃度依存性を解析して、親水性対イオン系もイオン対分配モードであることを確認している。

第4章では更に一歩進めて、水構造破壊試薬を含む水溶液を移動相とする新しい逆相分配クロマトグラフィーを提案している。ここでは、尿素とグアニジン塩酸塩の水溶液を用い、オクタデシルシリル化シリカ(CDS-SiO₂)固定相のアルキル基を溶媒和して逆相分配系を実現することに成功し、有害な有機溶媒を一切使用しない逆相分配クロマトグラフィーが可能であることを明らかにしている。

第5章ではイオン対分配における水構造破壊イオンの機能について詳細な検討と考察を行い、この種のイオンがイオン会合部分とその2相間分配部分の双方に影響を及ぼしていることを明らかにし、水構造破壊イオンを用いてイオン間の相互作用の制御が可能であることを明らかにしている。

第6章は総括である。

以上要するに本論文は、親水性対イオン、親水性構造破壊試薬を用いる液体クロマトグラフィーの創案とその超微量金属化学種の高性能分離・検出システムへの応用に成功したものであって、分離化学及び計測化学の発展に貢献するところ少なくない。

よって、本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認める。